

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**  
*Кафедра прикладной экологии*

**С.Ю. СЕЛИВАНОВСКАЯ, П.Ю. ГАЛИЦКАЯ, Л.Г.**  
**АХМЕТЗЯНОВА, П.А. КУРЫНЦЕВА**

**ТЕОРИЯ И МЕТОДЫ**  
**ЭКОЛОГИЧЕСКОГО НОРМИРОВАНИЯ**

**Казань – 2014**

**УДК 504.064**

**ББК Н83**

*Принято на заседании кафедры прикладной экологии*

*Протокол № 5 от 26 декабря 2014 года*

**Рецензент:**

кандидат химических наук,

доцент кафедры прикладной экологии КФУ **О.Г. Яковлева;**

**Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю., Ахметзянова Л.Г.,  
Курынцева П.А.**

**Теория и методы экологического нормирования / С.Ю.  
Селивановская, П.Ю. Галицкая, Л.Г. Ахметзянова, П.А. Курынцева. –  
Казань: Казан. ун-т, 2014. – 38 с.**

Учебное пособие предназначено для изучения дисциплины «Нормирование и снижение загрязнения окружающей среды» и сопровождения практических занятий. В пособии представлен теоретический материал о нормативах качества окружающей среды, нормативах предельно допустимого вредного воздействия на окружающую среду, нормативах использования природных ресурсов, а также методы оценки состояния объектов окружающей среды и обработки данных исследований.

Предназначено для студентов-бакалавров, обучающихся по направлению «Экология и природопользование»

© Селивановская С.Ю. с соавт., 2014

© Казанский университет, 2014

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Общие положения	6
1.1. Нормативы качества окружающей среды	6
1.2. Нормативы предельно допустимого вредного воздействия на окружающую среду	7
1.3. Нормативы использования природных ресурсов	8
1.4. Экологические стандарты	10
1.5. Нормативы санитарных и защитных зон	10
2. Оценка экологического состояния почв и водных объектов	11
2.1. Статистическая обработка результатов	12
2.2 Установление ЛД50 (ЛК50), ЛД10 (ЛК10) и БКр10 токсичного вещества	14
3. Методы оценки экологического состояния почв и водных объектов	15
3.1. Биотестирование	15
Работа 1. Определение экологического состояния модельных почвенных образцов почв методом биотестирования (элюатное биотестирование)	15
Биотестирование объектов с использованием семян редиса красного с белым кончиком <i>Raphanus sativus</i> (ISO 11269-2)	20
Биотестирование объектов с использованием зеленых водорослей <i>Chlorella</i> sp (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04).	21
Биотестирование объектов с использованием микроорганизмов <i>Pseudomonas putida</i> (ISO 10712)	25
Работа 2. Определение экологического состояния модельных почвенных образцов почв методом биотестирования (контактное биотестирование)	26
Определение фитотоксичности почв (контактный тест) (ISO 11269-2)	27
3.2. Биоиндикация	29
Работа 3: Определение экологического состояния почв (биоиндикация)	30
Респираторная активность почвенного микробного сообщества (ISO 14240-1)	31
Уреазная активность почвенного микробного сообщества	32
4. Распределение работ по занятиям	34
Литература	36

## **ВВЕДЕНИЕ**

В соответствии с природоохранным законодательством Российской Федерации нормирование качества окружающей среды производится с целью установления предельно допустимых норм воздействия, гарантирующих экологическую безопасность населения, сохранение генофонда, обеспечивающих рациональное использование и воспроизводство природных ресурсов в условиях устойчивого развития хозяйственной деятельности. При этом под воздействием понимается антропогенная деятельность, связанная с реализацией экономических, рекреационных, культурных интересов и вносящая физические, химические, биологические изменения в природную среду.

Определенная таким образом цель подразумевает наложение граничных условий (нормативов) как на само воздействие, так и на факторы среды, отражающие и воздействие, и отклики экосистем. Принцип антропоцентризма верен и в отношении истории развития нормирования: значительно ранее прочих были установлены нормативы приемлемых для человека условий среды (прежде всего, производственной). Тем самым было положено начало работам в области санитарно-гигиенического нормирования. Однако человек не самый чувствительный из биологических видов, и принцип «Защищен человек — защищены и экосистемы» неверен. Экологическое нормирование предполагает учет так называемой допустимой нагрузки на экосистему. Допустимой считается такая нагрузка, под воздействием которой отклонение от нормального состояния системы не превышает естественных изменений и, следовательно, не вызывает нежелательных последствий у живых организмов и не ведет к ухудшению качества среды.

Как закреплено в Конституции Российской Федерации, каждый гражданин России имеет право на благоприятную окружающую среду и на достоверную информацию о ее состоянии, что означает право жить в такой окружающей среде (ОС), в которой не возникает угроз для его здоровья и условий деятельности. Это право обеспечивается нормированием качества ОС («экологическим нормированием»).

Нормирование является важнейшим средством охраны ОС, регулирования природопользования и обеспечения безопасности в экологической сфере, которое широко применяется как в отечественной, так и зарубежной практике экологического менеджмента.

Экологическое нормирование - это установление показателей качества окружающей среды и предельно допустимых воздействий на нее, научная, правовая, административная деятельность, направленная на установление предельно допустимых норм воздействия (экологических регламентов, нормативов) на окружающую среду, при соблюдении которых не происходит деградация экосистем, гарантируется сохранение биологического разнообразия и экологическая безопасность населения.

Нормирование в области охраны окружающей среды - центральная идея Федерального закона "Об охране окружающей среды" (от 10.01.2002 N 7-ФЗ ред. от 21.11.2011, с изм. от 07.12.2011) Этому вопросу закон отводит главу V, статьи 19-28, а также главу VII, статьи 34-56, где подробно излагаются основы нормирования, требования к нормативам, нормативы, а также требования в области охраны ОС при осуществлении хозяйственной и иной деятельности при размещении, проектировании, строительстве, реконструкции, вводе в эксплуатацию, эксплуатации, консервировании и ликвидации зданий, строений, сооружений и иных объектов, различных отраслей промышленности.

Федеральный закон «Об охране окружающей среды» определяет нормирование в области охраны окружающей среды как деятельность по установлению «нормативов качества окружающей среды, нормативов допустимого воздействия на окружающую среду при осуществлении хозяйственной и иной деятельности, иных нормативов в области охраны окружающей среды, а также государственных стандартов и иных нормативных документов в области охраны окружающей среды». В природоохранной практике России, как и во всем мире, экологическое нормирование используется в качестве одной из основных мер или инструментов охраны окружающей среды.

Разработка и принятие экологических нормативов представляет собой одно из направлений природоохранной деятельности уполномоченных государственных органов.

Применительно к использованию отдельных природных ресурсов и их охране нормирование регулируется соответствующим природоресурсным законодательством - земельным, водным, лесным, об охране атмосферного воздуха, о животном мире и др.

В систему экологических нормативов входят:

- нормативы качества окружающей среды;
- нормативы предельно допустимого вредного воздействия на состояние окружающей среды;
- нормативы использования природных ресурсов;
- экологические стандарты;
- нормативы санитарных и защитных зон.

## **1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

### **1.1. Нормативы качества окружающей среды**

Нормативы качества окружающей среды устанавливаются в форме нормативов предельно допустимых концентраций (ПДК) вредных веществ, а также вредных микроорганизмов и других биологических веществ, загрязняющих окружающую среду, и нормативов предельно допустимых уровней (ПДУ) вредных физических воздействий на нее. Такие нормативы служат также для оценки состояния атмосферного воздуха, вод, почв по химическим, физическим и биологическим характеристикам. Установленные в соответствии с требованиями законодательства нормативы качества окружающей среды служат одним из юридических критериев для определения ее благоприятного состояния.

К нормативам качества окружающей среды относятся:

- нормативы, установленные в соответствии с химическими показателями состояния окружающей среды, в том числе нормативы предельно

допустимых концентраций химических веществ, включая радиоактивные вещества;

- нормативы, установленные в соответствии физическими показателями состояния окружающей среды, в том числе с показателями уровней радиоактивности и тепла;

- нормативы, установленные в соответствии с биологическими показателями состояния окружающей среды, в том числе с использованием видов и групп растений, животных и других организмов, используемых в качестве индикаторов качества окружающей среды, а также нормативы предельно допустимых концентраций патогенных микроорганизмов.

## **1.2. Нормативы предельно допустимого вредного воздействия на окружающую среду**

Согласно Федерального закона «Об охране окружающей среды» в целях предотвращения негативного воздействия на окружающую среду хозяйственной или иной деятельности для юридических и физических лиц - природопользователей устанавливаются следующие нормативы допустимого воздействия на окружающую среду:

- нормативы допустимых выбросов и сбросов веществ и микроорганизмов;
- нормативы образования отходов производства и лимиты на их размещение;
- нормативы допустимых физических воздействий (количество тепла, уровни шума, вибрации, ионизирующего излучения, напряженности электромагнитных полей и др.);
- нормативы допустимого изъятия компонентов природной среды;
- нормативы допустимой антропогенной нагрузки на окружающую среду.

Эти нормативы должны обеспечить соблюдение нормативов качества окружающей среды с учетом природных особенностей территорий, акваторий. За превышение установленных нормативов допустимого воздействия на окружающую среду субъекты хозяйственной и иной деятельности в зависимости от причиненного окружающей среде вреда несут ответственность в соответствии с законодательством.

Нормативы допустимого воздействия устанавливают требования к источнику вредного воздействия, ограничивая его деятельность определенной пороговой концентрацией. Это, прежде всего, относится к выбросам и сбросам.

Под выбросами понимают поступление вредных веществ в атмосферу. Сброс - поступление вещества вместе со сточными водами в водные объекты.

### **1.3. Нормативы использования природных ресурсов**

Нормативы использования (изъятия) природных ресурсов устанавливаются, чтобы обеспечить предупреждение истощения природных ресурсов, с учетом их самовосстановления, предотвращения нарушений равновесия в окружающей природной среде. В отношении невозобновимых природных ресурсов, например, минеральных, такие нормативы должны определять социально и экономически обоснованный режим их использования (добычи).

Нормативы допустимого изъятия компонентов природной среды - это нормативы, установленные в соответствии с ограничениями объема их изъятия в целях сохранения природных и природно-антропогенных объектов, обеспечения устойчивого функционирования живых экологических систем и предотвращения деградации.

Нормативы допустимого изъятия компонентов природной среды определяются законодательством о недрах, животном мире, земельным, водным, лесным законодательством и лицензированием - предоставлением прав на ведение хозяйственной деятельности при наличии необходимого разрешения.



Лицензия представляет собой разрешительный документ, в котором фиксируются условия пользования (потребления) объектами природы, конкретные ограничения технического воздействия на отдельные природные среды, ресурсы и экологические системы.

В настоящее время осуществление многих видов деятельности по природопользованию и воздействию на состояние природной среды предполагает наличие специальной лицензии. Подобным образом происходит пользование недрами, включая бурение скважин для пользования подземной водой, переработка, транспортировка и хранение углеводородного сырья, деятельность по утилизации отходов производства и потребления, геодезическая и картографическая деятельность и т.д. Перечень всех видов деятельности содержится в утвержденном Правительством РФ положении о лицензировании отдельных видов деятельности в области охраны окружающей среды.

В соответствии с Федеральным законом от 08.08.2001 N 128-ФЗ (ред. от 29.12.2010) "О лицензировании отдельных видов деятельности" (с изм. и доп., вступающими в силу с 01.01.2011) право на выдачу лицензий и заключение соответствующих лицензионных договоров обладают федеральные, специально уполномоченные органы охраны окружающей среды и природопользования

В последние годы определенное развитие получил порядок выдачи лицензий на конкурсной основе, что призвано повысить степень обоснованности их выдачи, а также получить более высокие доходы за право получения лицензий.

Большое значение имеет также качество, заключаемых лицензионных договоров. Так, в случае пользования недрами важно, чтобы в них в полной мере отражались требования комплексной добычи и переработки минерального сырья, предотвращения загрязнения природной среды, проведения компенсирующих природоохранных мероприятий.

## **1.4. Экологические стандарты**

Понятие «экологические стандарты» прежде всего, включает в себя собственно стандарты как формы нормативных документов, в которых определяются отдельные экологические требования. В качестве примеров экологических стандартов можно назвать следующие: ГОСТ 17.2.4.02-81. Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ; ГОСТ 17.1.3.12-86. Охрана природы. Гидросфера. Общие правила охраны вод от загрязнения при бурении и добыче нефти и газа на суше; ГОСТ 17.4.2.03-86. Охрана природы. Почвы. Паспорт почвы; ГОСТ 20286-76. Радиоактивное загрязнение и дезактивация. Термины и определения; и др. Требования, установленные государственными стандартами для обеспечения безопасности продукции, работ и услуг для окружающей среды, жизни и здоровья, являются обязательными для соблюдения государственными органами управления, субъектами хозяйственной деятельности.

## **1.5. Нормативы санитарных и защитных зон**

В природоохранной практике Российской Федерации имеется ряд видов зон, создание которых связано с целями охраны окружающей среды от вредных воздействий. В их числе - санитарно-защитные зоны, создаваемые между предприятиями и жилыми домами; водоохранные зоны (полосы) рек, озер и водохранилищ; округа санитарной (горно-санитарной) охраны курортов и лечебно-оздоровительных местностей; зоны санитарной охраны источников водоснабжения; запретные полосы лесов по берегам водных объектов и др. Помимо специального режима таких зон в законодательстве предусматриваются нормативы, определяющие их размеры. Правовой режим таких зон закрепляется в законах, правительственных постановлениях, ведомственных нормативных актах.

Зонирование устанавливает вид использования территорий, а также определяет их функциональное назначение и ограничения на использование.

Территориальное зонирование, как и соблюдение ограничений, установленных на использование территорий отдельных зон, является необходимым условием динамического экологического равновесия и устойчивого природопользования.

Так, в соответствии с Градостроительным кодексом РФ выделяются следующие основные функциональные зоны:

- общественно-деловые;
- производственные;
- инженерной и транспортной инфраструктуры;
- рекреационные;
- сельскохозяйственного использования;
- специального назначения;
- военных объектов.

С учетом ограничений на ведение хозяйственной (в том числе градостроительной) деятельности также выделяются зоны:

- особо охраняемых территорий;
- санитарные и санитарно-защитные;
- водоохранные зоны и прибрежные защитные полосы;
- санитарной охраны источников водоснабжения-
- залегания полезных ископаемых;
- чрезвычайных экологических ситуаций и экологического бедствия;
- с экстремальными природно-климатическими условиями и др.

## **2. ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ И ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

Для оценки экологического состояния почв и водных объектов помимо методов химического анализа применяют и биологические методы, лежащие в основе биотестирования и биоиндикация. При биотестировании анализируют влияние исследуемого образца на биологический объект, культивируемый в лабораторных условия. В качестве контроля может использоваться почва (вода) фоновых территорий, или среда, в которой культивируются тестовые организмы.

Методы биоиндикации предполагают оценку динамических или статических характеристик аборигенных организмов.

Экологическая опасность элементов или соединений (в чистом виде, либо присутствующих в почве или в воде), характеризуется следующими показателями - ЛД<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>), ЛД<sub>10</sub> (ЛК<sub>10</sub>) – летальная доза (концентрация) вещества, вызывающая 50% или 10% гибель тест-объекта. В том случае, когда фиксируемой реакцией является не гибель организма, а какая-то другая тест-функция определяют ЕС<sub>50</sub>, ЕС<sub>10</sub> – так называемую эффективную концентрацию, вызывающую 50% или 10% ингибирование изучаемой функции организма, популяции или биоценоза. В зарубежной литературе встречаются такие показатели как LOEC (lowest observed effect concentration) – концентрация, при которой наблюдается минимальный эффект, и NOEC (no observed effect concentration) – концентрация, следующая сразу после концентрации, вызывающей минимальный эффект. При определении качества почвы или водного образца в целом определяют БКр<sub>10</sub> – безвредную кратность разбавления. Считается, что при изменении численности популяции не более, чем на 10% она может восстановиться самостоятельно до исходного состояния, поэтому находят концентрацию, оказывающую 10% ингибирование тест-функции.

## 2.1. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Перед расчетом ЛД<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>), ЛД<sub>10</sub> (ЛК<sub>10</sub>) и БКр<sub>10</sub> результаты анализа подвергают статистической обработке. Для статистической обработки результатов необходимо провести расчеты для каждой серии определения анализируемого параметра опытного варианта и контроля и сопоставить полученные результаты. Проводят следующие расчеты:

- определение среднего арифметического ( $\bar{x}$ ) значения параметра в контрольном и опытном вариантах:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \text{ где}$$

$x_i$  – значения повторностей определения;

$n$  – количество повторностей;

- определение среднеквадратичного отклонения ( $\sigma$ ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}};$$

- определение ошибки среднего арифметического показателя ( $m$ ):

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}};$$

- определение показателя достоверности ( $t_g$ ) разности двух сравниваемых величин:

$$t_g = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_t}{\sqrt{m_k^2 + m_t^2}},$$

где  $x_k$  и  $x_t$  – среднее арифметическое показателя в контроле и опытном варианте;  
 $m_k^2$  и  $m_t^2$  – квадраты ошибок среднего арифметического в контроле и опытном варианте.

Рассчитанный показатель достоверности сравнивается с критерием Стьюдента для определения которого принимается уровень значимости  $P=0,05$  и определяется число степеней свободы  $f$  как

$$f = n_k + n_t - 2, \text{ где}$$

$n_k$  и  $n_t$  – число наблюдений (повторностей) в контроле и опытном варианте.

Критерий достоверности Стьюдента определяется по стандартным таблицам.

Если рассчитанное  $t_g \geq t_{st}$ , то различия в значениях опытного и контрольного параметра достоверны, а не случайны.

В этом случае принимают, что образец оказывает достоверный эффект. Если  $t_g \leq t_{st}$ , то выявленные различия в длине проростков в контроле и опытном варианте недостоверны, следовательно, образец не оказывает достоверного воздействия.

## 2.2 УСТАНОВЛЕНИЕ ЛД<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>), ЛД<sub>10</sub> (ЛК<sub>10</sub>) И БКР<sub>10</sub> ТОКСИЧНОГО ВЕЩЕСТВА

Среднюю летальную (эффективную) концентрацию ЛК<sub>50</sub> (ЕС<sub>50</sub>) или среднее летальное разбавление ЛР<sub>50</sub> как и безвредную кратность разбавления (БКР<sub>10</sub>) устанавливают графическим способом (рис. 1). Для этого, на оси абсцисс откладывают величины концентраций вещества или кратности разбавления пробы (водной вытяжки), а на оси ординат - результаты определения тест-функции (например, гибель тест-объектов, выраженная в процентах по отношению к контролю). Таким образом, на графике получаем точки, характеризующие изменение тест-функции в зависимости от концентрации или кратности разбавления пробы. При наличии линейной зависимости, через полученные точки проводят прямую, либо находят на кривой линейный участок и также проводим прямую. Потом из точки на оси ординат, которая соответствует 50% изменению тест-функции для ЛК<sub>50</sub> и 10% для БКР<sub>10</sub>, проводят линию, параллельную оси абсцисс, до пересечения с линией графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точке пересечения перпендикуляра и оси абсцисс соответствует ЛК<sub>50</sub> или БКР<sub>10</sub>. Находят значение ЛК<sub>50</sub> или БКР<sub>10</sub> в мг/кг или мг/л если на графике откладывалась концентрация. В случае использования кратности разбавления пробы (водной вытяжки) по графику находят значение ЛР<sub>50</sub> или БКР<sub>10</sub> в процентах или безразмерных величинах (в кратности разбавления, долях и др.).

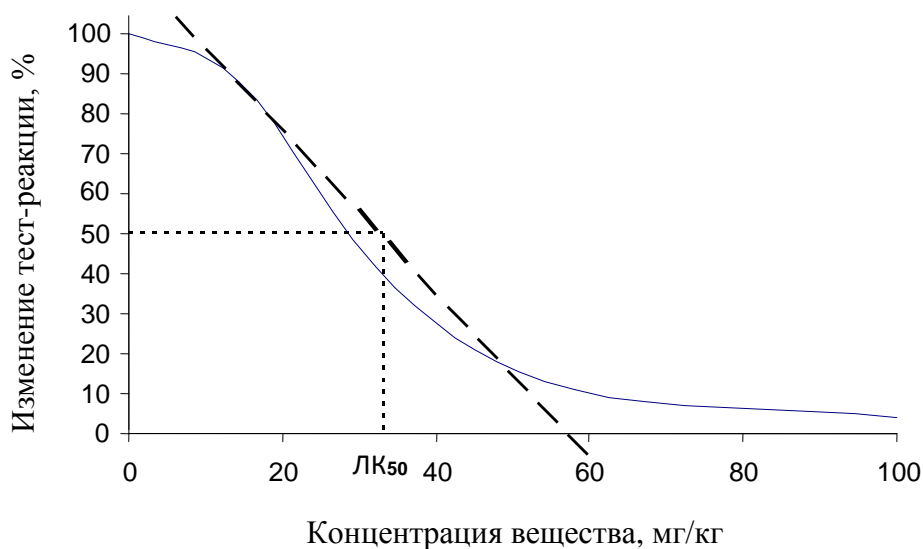


Рис 1. График для определения ЛК<sub>50</sub>

### **3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ И ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

#### **3.1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ**

В настоящее время существует два основных подхода к оценке состояния таких объектов с использованием биотестирования. В зависимости *от способа контакта* тест-организмов с загрязненной средой тесты можно разделить на *элюатные* и *контактные*.

В элюатных тестах из исследуемой почвы или жидкости делается водная вытяжка, и эта вытяжка исследуется на токсичность. Полученные результаты экстраполируются на исследуемую среду. При этом считается, что лишь водорастворимые токсиканты или формы токсикантов являются биодоступными, а значит, воздействуют на организмы.

В контактных тестах происходит непосредственное воздействие компонентов загрязненной среды с организмами. При этом на тест-объекты влияют как растворимые, так и ассоциированные формы токсикантов.

#### **Работа 1. Определение экологического состояния модельных почвенных образцов почв методом биотестирования (элюатное биотестирование)**

В данной работе оценивается токсичность модельных почвенных образцов, загрязненных тяжелыми металлами, наиболее характерными для РТ (Cu, Ni, Cd, Pb). Приготовление почвенных образцов производится за 1-2 недели до начала эксперимента. Определение концентрационного ряда производится, исходя из установленных ПДК. Для каждого из металлов содержание в почве будет составлять 0, 1, 5 и 10 ПДК. Исходная почва отбирается на фоновых территориях и считается условно свободной от тяжелых металлов. Расчет следует вести относительно ПДК для песчаных и супесчаных почв, представленных в таблице 1.

ПДК для меди, никеля, кадмия и свинца для песчаных и супесчаных почв

Металл	ПДК для песчаных и супесчаных типов почв, мг/кг
Cu	33
Ni	20
Cd	0,5
Pb	32

Объект исследования: Модельные почвенные образцы.

Методы исследования:

1. Определение фитотоксичности водного экстракта почвы с использованием семян редиса *Raphanus sativus*.
2. Определение токсичности водного экстракта почвы с использованием зеленых водорослей *Chlorella sp.*
3. Определение токсичности экстракта почвы с использованием микроорганизмов *Pseudomonas putida*.

Задачи исследования:

1. Определить ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для различных тест-объектов.
2. Сравнить чувствительность используемых тест-объектов по отношению к водным вытяжкам.
3. Сравнить токсичность исследуемых водных вытяжек из почв, загрязненных солями различных металлов, для тест-объектов.
4. Провести сравнение установленных значений ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для используемых тест-объектов с существующими значениями ПДК для анализируемых металлов.

Средства измерений и материалы

1. колбы конические объемом 250 мл, воронки, стаканы объемом 100 мл, бумажные фильтры, шейкер для приготовления водных вытяжек;
2. чашки Петри диаметром 10 см - по 3 шт. на каждую пробу; диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см - по одному на каждую чашку Петри;



пипетки стеклянные с резиновыми грушами вместимостью 5, 10 мл или дозаторы аналогичного объема;

3. пенициллиновый пузырьки с крышками, пробирки пластиковые объемом 1,5 мл, ручной автоматический счетчик клеток Scepter с наконечниками, спектрофотометр СФ-102, кюветы на 10 мм;

4. стерильные колбы на 100 мл, стерильные пипетки на 1 мл, спиртовая горелка, стерильный бокс;

5. стерильные пробирки на 10 мл, дозатор одноканальный 200 мкл, стерильные наконечники для дозатора 200 мкл, фотометр микропланшетный Multiscan FC, стерильный планшет на 96 ячеек.

### Ход работы

#### 1. Определение влажности почвы.

Поскольку содержание металлов указывается на сухую почву, для расчета количества вносимых металлов необходимо предварительно определить влажность почвы. Для этого в металлический или стеклянный бюкс, высушенный до постоянной массы, помещают навеску почвы массой 5-10г. Сушат почву до постоянной массы при температуре 105<sup>0</sup>С. Затем определяют массу высушенной почвы.

Влажность почвы рассчитывают как разность массы сырой и высушенной почвы, отнесенной к массе сырой почвы, выраженной в процентах.

$$\text{Влажность (\%)} = (M_{\text{сп}} - M_{\text{вп}}) / M_{\text{сп}}$$

Содержание абсолютно сухой почвы (СП) равно 100% - % влажности почвы, т.е.

$$\text{СП (\%)} = 100 - \text{влажность (\%)}$$

#### 2. Подготовка почвы.

Учитывая влажность почвы, в стеклянные стаканы помещают по 500 г почвы в расчете на сухую массу. Для каждого металла готовим по 3 инкубационных сосуда (по 1 сосуду на каждую из 3-х концентраций) и

контрольный вариант. Таким образом, общее число стаканов с почвой составит 13 штук.

Модельные почвенные образцы готовятся путем добавления в почву раствора модельного токсиканта (соль металла). Схема внесения растворов токсикантов представлена в таблице 5.

### 3. Приготовление добавляемых растворов токсикантов.

Для наиболее равномерного внесения токсикантов в почву рациональнее вносить не соль в виде порошка, а раствор данной соли. Так как в состав соли входят не только атомы металла, но и другие химические элементы, необходимо сделать расчет навески соли металла, необходимой для приготовления раствора заданной концентрации с учетом массовой доли металла в соли:

$$\omega = M_{\text{металла}} \cdot n / M_{\text{соли}}, \text{ где}$$

$\omega$  - массовая доля металла в соли;

$M_{\text{металла}}$  - атомная масса металла;

$n$  - число атомов металла в соли;

$M_{\text{соли}}$  - молярная масса соли ;

Для получения навески взятой для эксперимента соли представленные в таблице 2 численные значения навески металлов необходимо разделить на значение  $\omega$ . Для растворения солей металлов используется культивационная или кипяченая водопроводная вода.

Таблица 2

Схема внесения растворов токсикантов

№ стакана и почвенного образца	Масса почвы в стакане, в расчете на сухое в-во, г	Содержание металла в почве, в значениях ПДК	Объем добавляемого раствора, мл	Cu, навеска чистого металла, мг	Ni, навеска чистого металла, мг	Cd, навеска чистого металла, мг	Pb, навеска чистого металла, мг
0	500	0	150	0	0	0	0
1	500	1	150	16.5	10	0.25	16
2	500	10	150	165	100	2.5	160
3	500	50	150	825	500	12.5	800

Полученные навески солей необходимо растворить полностью в 150 мл дистиллированной воды.

#### 4. Приготовление модельных почвенных образцов.

К 500 г почвы в расчете на сухое вещество при тщательном перемешивании необходимо добавить 150 мл раствора с концентрацией, указанной в таблице. Стаканы маркируют соответственно добавляемому металлу и номеру стакана, указанному в таблице, например, Cu1, Pb2, Ni3. Стакан с условно чистой почвой (отобранной с фоновых территорий) маркируют буквой «К» и считают контрольной.

После добавления растворов почва тщательно перемешивается. По окончании перемешивания почва должна быть равномерно увлажнена. Степень увлажнения должна быть достаточно высокой, однако, не мешающей аэрации. При необходимости, после добавления 150 мл растворов можно доувлажнить почву дистиллированной водой до ее содержания 60% от общей влагоемкости.

Модельные почвенные образцы в стаканах с маркировками помещаются в термостат (28<sup>0</sup>С) на 7 дней. Каждые 1-2 дня почву необходимо перемешивать и, при необходимости, увлажнять дистиллированной водой. Данная процедура необходима для формирования в почве устойчивого микробного сообщества в новых условиях, а также для перехода тяжелых металлов в формы, характерные для природных систем.

#### 5. Приготовление водных экстрактов

Почвы выдерживают в сушильном шкафу при температуре 60<sup>0</sup>С до сухого состояния, охлаждают, гомогенизируют в почво-измельчителе, взвешивают навеску. Для определения токсичности берут 1 часть высушенного образца и 10 части культивационной воды (по массе) и перемешивают полученную смесь в течение 1 ч. После отстаивания ее фильтруют через бумажный фильтр (белая, красная ленты). Для ускорения процесса смесь почвы с водой после перемешивания можно центрифугировать. Если растворы получились мутными, то их фильтруют второй раз.

Проба, подлежащая биотестированию, должна иметь pH 7,0-8,0; если pH выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют 10% раствором HCl, подщелачивание - 10% раствором NaOH.

соляная кислота 10%: В мерной колбе на 1000 мл к 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды 360 мл концентрированной соляной кислоты (d=1,19) и доводят до метки.

гидроксид натрия 10%. В мерной колбе на 1000 мл в дистиллированной воде растворить 100 г гидроксида натрия и довести до метки.

Проведение анализа.

Полученные водные экстракты тестируются методами, описанными ниже.

### Методы биотестирования

#### Биотестирование объектов с использованием семян редиса красного с белым кончиком *Raphanus sativus* (ISO 11269-2)

Принцип методики основан на оценке влияния водного экстракта или водных растворов на интенсивность прорастания семян редиса *Raphanus sativus* (Сорт «Красный с белым кончиком») *Raphanus*.

##### Методика определения

Опыт проводят в трехкратной повторности, т.е. по 3 чашки Петри на один исследуемый образец. В чашки Петри раскладывают диски фильтровальной бумаги диаметром 9 см. В каждую чашку укладывают равномерно по 10 семян, затем наливают по 5 мл исследуемых вытяжек или исследуемых растворов. В качестве контроля используют дистиллированную воду или культивационную воду, в зависимости от того на какой воде были приготовлены растворы или водные вытяжки. Уровень жидкости в чашках должен быть ниже поверхности семян. Чашки закрывают и помещают в термостат при температуре 20 °C.

Через 3 сут. измеряют длину корней проростков. У непроросших семян длину корня принимают равной нулю. Уровень фитотоксичности (Т,%) рассчитывается по следующей формуле:

$$T = \frac{X_{\text{контр}} - X_{\text{оп}}}{X_{\text{контр}}} * 100,$$

При определении фитотоксичности исследуемых проб, а также их разбавлений в случае, если показатель ингибирования превышает 50% или 10% (в зависимости от устанавливаемого показателя), рассчитывают среднюю летальную концентрацию токсичных веществ в пробе, вызывающую ингибирование прорастания тест-объектов на 50% - ЛК<sub>50</sub> или безвредную кратность разбавления пробы (БКР<sub>10</sub>), вызывающую ингибирование прорастания тест-объекта не более 10% - БКР<sub>10</sub>, соответственно. Методика определения ЛК<sub>50</sub> и БКР<sub>10</sub> представлена в п. 2.2.

### **Биотестирование объектов с использованием зеленых водорослей *Chlorella sp* (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04).**

Принцип методики основан на оценке влияния токсичных компонентов на скорость размножения *Chlorella sp*. Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсичных веществ (контроль), и тестируемых проб, водных вытяжек из почвы. Критерием токсичности является 20% и более подавление роста или 30% и более стимуляция роста культуры водорослей, выращиваемой в течение 22 ч. на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. Определение роста культуры проводят путем измерения оптической плотности суспензии водорослей или подсчетом количества клеток водорослей в растворе.

#### Методика определения

Перед биотестированием культура водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенная на 50% среде Тамия в культиваторе КВ-05 (Рис 2), профильтровывается через 4 слоя марли или вату и разбавляется средой Тамия до оптической плотности  $D=0,125\pm0,005$ . Регистрация оптической плотности проводится с использованием КФК-3 в кювете толщиной 10 мм при длине волны 670 нм. Подготовленная тест-культура водоросли вносится по 2 мл в стакан с 48 мл контрольной или тестируемой пробами воды (вытяжки). При этом в результате 25-ти кратного разбавления засеваемой культуры содержание элементов питания будет

соответствовать 2% среде Тамия, а исходная оптическая плотность тест-культуры водоросли будет равна 0,005. Содержимое стаканов разливается во флаконы по 6 мл (по 4 флакона на каждый вариант тестируемой пробы, включая контрольную пробу). Все флаконы закрываются чистыми полиэтиленовыми крышками, в которых для обеспечения воздухообмена сделаны отверстия диаметром 6 мм. Перед использованием пробки необходимо залить кипящей водой, выдержать в ней 10 минут, слить воду и просушить. Далее закрытые флаконы помещаются в культиватор КВМ-5 (Рис 2) на 22 ч, с температурой  $36 \pm 0,5$  °С, средней интенсивностью света – 60 Вт/м<sup>2</sup>.



Рис 2. Культиватор водорослей КВ-05 и КВМ-5, пенициллиновые пузырьки

Через 22 ч флаконы достаются из культиватора и производится изменение оптической плотности. Если оптическая плотность тест-культуры в контрольном варианте более 0,120, то эксперимент можно считать удачным, если оптическая плотность в контрольном варианте более 0,180, то на 1-2 часа следует сократить время эксперимента.

Оптическую плотность измеряют с использованием спектрофотометра СФ-102 (Рис 3) в кювете толщиной 10 мм при длине волны 670 нм. Далее рассчитывают среднее значение оптической плотности для каждого варианта:

$$X = \sum X_i / n,$$

где  $X_i$  - среднее значение оптической плотности в  $i$ -том параллельном эксперименте,

$n$  – количество параллельных определений.



Рис. 3. Спектрофотометр СФ-102

Количество клеток в растворах определяют путем прямого подсчета клеток с помощью ручного автоматического счетчика клеток Scepter (Рис 4). Разводится суспензия клеток в 1,5 мл микропробирке средой Тамия, чтобы концентрация клеток попадала в динамический диапазон инструмента (50000-5000000 клеток/мл). Минимальный объем для точного подсчета составляет 100мкл.

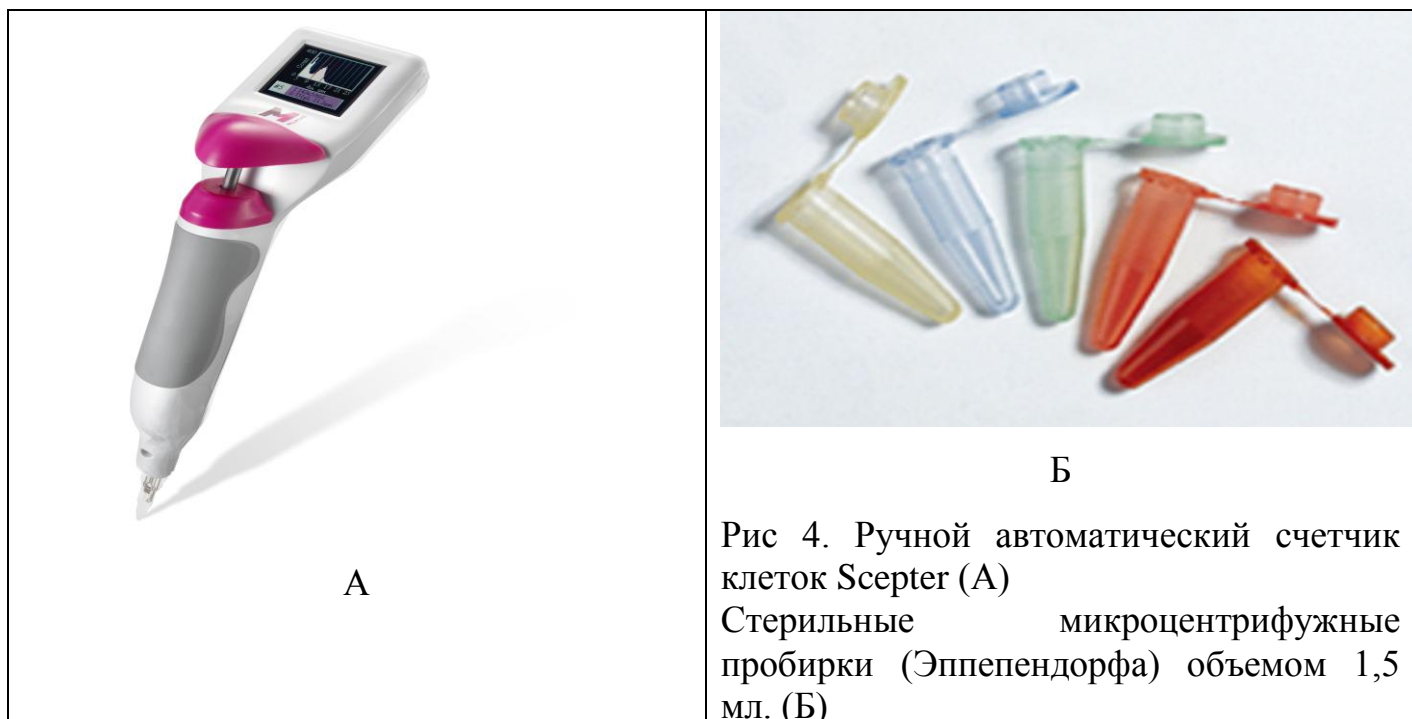


Рис 4. Ручной автоматический счетчик клеток Scepter (А)  
Стерильные микроцентрифужные пробирки (Эппендорфа) объемом 1,5 мл. (Б)

Включается счетчик. На экране появится надпись Attach Tip to Begin.

Надевается специальный наконечник, если это будет сделано правильно, то на экране появится надпись Characterizing the Tip.

Для подсчета клеток следуйте инструкциям, появляющимся на дисплее. Когда на экране появится надпись Count Complete, снимите наконечник и утилизируйте его. На экране появится гистограмма с номером теста, датой и временем. Результаты отражены под гистограммой:

- концентрация клеток (кл/мкл),
- размер клеток (мкм),
- клеточный объем (пиколитры)

Далее рассчитывают относительную (%) разницу величины показателей в опытных вариантах по сравнению с контролем:

$$I = (X_k - X_o) / X_k * 100\%, \text{ где}$$

$X_k$  и  $X_o$  средние значения показателя в контроле и опыте соответственно.

Критерием токсичности является 20% и более подавление роста или 30% и более стимуляция роста культуры водорослей.

#### Приготовление среды Тамия (50%).

В 1000 мл воды растворяют 2,5 г нитрата калия ( $KNO_3$ ), 1,25 г сульфата магния семиводного ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 0,625 г фосфата калия двузамещенного трехводного ( $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ ), 0,0015 г железа лимоннокислого (растворять при кипячении), 0,5 мл раствора микроэлементов А и 0,5 мл раствора микроэлементов Б.

#### Приготовление раствора микроэлементов А.

В 1000 мл воды растворяют 2,86 г борной кислоты ( $H_3BO_3$ ), 1,81 г хлорида марганца четырехводного ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ), 0,222 г сульфата цинка пятиводного ( $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ ).

#### Приготовление раствора микроэлементов Б.

В 1000 мл воды растворяют – 17,64 г оксида молибдена ( $MoO_3$ ), 22,96 г ванадата аммония ( $NH_4VO_3$ ) (растворять при нагревании)



Каждый раствор отдельно стерилизуют кипячением в течение 30 минут, плотно закрывают и хранят в холодильнике не более 3 мес. при температуре от 2 до 4 °С

### **Биотестирование объектов с использованием микроорганизмов *Pseudomonas putida* (ISO 10712)**

Принцип методики основан на оценке влияния токсичных компонентов на скорость роста бактерии *Pseudomonas putida*.

#### Методика определения

Основой метода является определение концентрации клеток *Pseudomonas putida* через 16 ч инкубирования с пробой воды (водной вытяжки). Концентрация клеток определяется методом оптической плотности. Далее определяются концентрации, оказывающие 10% и 50% ингибирование роста культуры *Pseudomonas putida*.

Подготовка культуры *Pseudomonas putida* для опыта.

*Pseudomonas putida* выращивается на питательной среде L-бульон. За 48 часов готовится пре-культура: в колбу на 100 мл с 20 мл стерильной питательной среды вносится 1 мл культуры *Pseudomonas putida*. Культура *Pseudomonas putida*, которая будет использоваться для опыта, готовится аналогично пре-культуре за 24 часа, для этого в колбу на 100 мл с 20 мл стерильной среды вносят 1 мл пре-культуры.

#### Проведение эксперимента:

В стерильных условиях для каждого образца и контрольного варианта в стерильную пробирку отбирают:

- 8 мл водного образца (вытяжки) либо стерильной воды для контрольного варианта;
- 1 мл подготовленной культуры *Pseudomonas putida*;
- 1 мл раствора питательных веществ.

Содержимое пробирки перемешивают, затем стерильно переносят по 0,2 мкл в стерильный планшет в 4 повторностях (4 лунки в планшете для каждого образца). Планшет устанавливают в фотометр микропланшетный Multiscan FC

(Рис 5), задавая программу с длительностью измерения 16 ч, с интервалом измерения 1 раз в 10 минут, и перемешиванием 1 раз в 10 минут (непосредственно перед измерением). Для расчета кинетических параметров выбирают вычитание базовой линии, усреднение результатов измерений для каждого образца и расчет площади под кривой роста.



Рис 5. Фотометр микропланшетный Multiscan FC

Далее рассчитывают относительную (%) разницу величин площади под кривой роста в опытном варианте по сравнению с контролем:

$$I = (S_k - S_o) / S_k * 100\%, \text{ где}$$

$S_k$  и  $S_o$  средние значения оптической плотности в контроле и опыте соответственно.

В случае если показатель ингибирования роста бактерий превышает 50% и 10%, рассчитывают среднюю летальную содержание токсиканта в почве, вызывающее ингибирование роста бактерий на 50% - ЛКР50 и безвредное содержание токсиканта в почве, вызывающее ингибирование роста бактерий не более 10% - БКР10, соответственно.

## **Работа 2. Определение экологического состояния модельных почвенных образцов почв методом биотестирования (контактное биотестирование)**

В данной работе аналогично работе №1 оценивается токсичность модельных почвенных образцов, загрязненных тяжелыми металлами, наиболее

характерными для РТ (Cu, Ni, Cd, Pb). Однако в отличие от элюатного биотестирования при контактом биотестировании приготовленные модельные почвенные образцы используют непосредственно.

Объект исследования: Модельные почвенные образцы.

Методы исследования:

1. Определение фитотоксичности почвы с использованием овса посевного *Avena sativa* (контактное биотестирование).

Задачи исследования:

1. Определить ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для тест-объекта.
2. Сравнить токсичность исследуемых почвенных образцов, загрязненных солями различных металлов, для тест-объекта.
3. Провести сравнение установленных значений ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для используемого тест-объекта с существующими значениями ПДК для анализируемых металлов.

Средства измерений и материалы

1. Весы технические, стаканы пластиковые 250 мл по 3 шт. на пробу, линейка.

Ход работы

1. В работе используют модельные почвенные образцы, полученные при выполнении Работы 1.
2. Произвести измерение фитотоксичности почвы с использованием овса посевного *Avena sativa*.

### **Определение фитотоксичности почв (контактный тест) (ISO 11269-2)**

Принцип методики основан на оценке влияния токсичных компонентов на интенсивность прорастания семян и ранние стадии роста (общую биомассу и длину корней и наземной части) ряда растений. В качестве тест-объектов рекомендуется использовать семена следующих растений - рожь (*Secale cereal L.*), рейграсс (*Lolium perenne L.*), рис (*Oryza sativa L.*), овес (*Avena sativa*), мягкая пшеница (*Triticum aestivum L.*), зимний или весенний ячмень (*Hordeum vulgare L.*), сорго (*Sorghum bicolor*

*L.*), горчица (*Sinapis alba L.*), рапс (*Brassica napus L.*), редис (*Raphanus sativus L.*), китайская капуста (*Brassica campestris L.*), салат латук (*Lactuca sativa L.*), кресс салат (*Lepidium sativum L.*), томат (*Lycopersicon esculentum M.*), бобы (*Phaseolus aureus R.*).

#### Методика определения

Подготовленные для анализа модельные образцы почвы взвешивают по 100 г и помещают в инкубационные сосуды. В качестве контроля используют чистую почву. Почву размещают так, чтобы избежать каких-либо уплотнений, при необходимости измельчают. Увлажняют до 60% общей влагоемкости и поддерживают такую влажность на протяжении всего периода инкубации. Засеивают почву 5-10 семенами растений. Опытные и контрольные образцы закладывают в трех повторностях. Инкубирование осуществляют при одинаковой температуре и освещенности.

Оценку результатов производят не ранее чем через 10 сут. и не позже чем через 21 сут. инкубации. Во-первых, отмечают количество проросших семян в опытном и контрольном варианте. В каждой повторности измеряют длину корней, высоту побега, всхожесть и их общую биомассу растений. Для того чтобы не повредить корни каждый инкубационный сосуд помещают на бок в слой воды и вымывают почву. Предпочтительно определять биомассу сухих растений, для этого оставить их в сушильном шкафу на 16 ч. при температуре 70-80 С.

Для каждого из определенных показателей рассчитывают ингибирование (I):

$$I = (100 - \text{кол-во в опыте}) * 100 / \text{кол-во в контроле}$$

В случае, если показатель ингибирования превышает 50% и 10%, рассчитывают среднюю эффективную концентрацию, вызывающую ингибирование прорастания тест-объектов на 50% - EC<sub>50</sub> и безвредную концентрацию, вызывающую ингибирование прорастания тест-объекта не более 10% - БК10, соответственно. Методика определения аналогична методике определения ЛК50 и БКР10 представленной в п. 2.2

### 3.2. БИОИНДИКАЦИЯ

Биоиндикация – биологический метод, основанный на оценке изменения параметров организмов, популяций и сообществ, представителей аборигенной флоры и фауны.

Большое количество биоиндикационных методов разработано на основе микроорганизмов, например, оценка общей микробной биомассы, микробного разнообразия, ферментативной активности, скорости потребления кислорода. Эти методы широко распространены благодаря тому, что они чувствительны, дают быстрый ответ на воздействие токсиканта или другое воздействие на окружающую среду. Однако необходимо помнить, что при использовании методов биоиндикации возникает проблема интерпретации результатов. Так, для того, чтобы оценить интенсивность антропогенного воздействия необходима информация о состоянии организма биоиндикатора в, так называемых, фоновых условиях, то есть в отсутствии негативного воздействия токсиканта. При этом контрольный (незагрязненный) образец должен обладать такими же характеристиками (физическими, механическими, агрохимическими и т.д.), что и анализируемый образец. Трудность, а иногда и невозможность нахождения такого образца является основным недостатком методов биоиндикации.

Большинство микробных параметров являются интегральными, что означает, что один параметр отражает, например, метаболические процессы, осуществляемые двумя или большим количеством видов. Поэтому, даже если происходит ингибирование одного, наиболее чувствительного вида, активность остальных видов позволяет остаться общей метаболической активности неизменной. Например, при определении параметра «общая микробная биомасса» оценивается сумма биомасс всех видов микроорганизмов, присутствующих в образце, таких как бактерий, микроскопических грибов, актиномицетов, архей. Токсиканты по разному воздействуют на различные группы организмов. Так, биомасса первой группы может увеличиваться, второй уменьшаться, а третьей – оставаться без изменений. Поэтому такой параметр как общая микробная биомасса, который является важным с экологической точки зрения индексом,

может быть недостаточно чувствительным к токсикантам из-за комбинации стимулирующих и ингибирующих эффектов в отношении различных членов микробного сообщества. Кроме того, результаты, полученные методами биоиндикации, могут зависеть от ряда случайных факторов, таких как погодные условия (температура и влажность) в момент взятия образца. Привести к необъективности оценки может возможная адаптация природных сообществ к загрязнению почвы, что также является недостатком биоиндикационных методов.

Более надежным для оценки состояния объекта в условиях воздействия токсикантов является одновременное определение нескольких параметров.

### **Работа 3: Определение экологического состояния почв (биоиндикация)**

В данной работе оценивается влияние модельных почвенных образцов, загрязненных тяжелыми металлами, наиболее характерными для РТ (Cu, Ni, Cd, Pb) в отношении аборигенной почвенной микрофлоры. В работе используют модельные почвенные образцы, полученные при выполнении Работы 1.

Объект исследования: Модельные почвенные образцы.

Методы исследования:

1. Определение респираторной активности почвенного микробного сообщества.
2. Определение уреазной активности почвенного микробного сообщества.

Задачи исследования:

1. Определить ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для разных видов активностей.
2. Сравнить токсичность исследуемых почвенных образцов, загрязненных солями различных металлов, для микробной активности.
3. Провести сравнение установленных значений ЛКр<sub>50</sub> и ЛКр<sub>10</sub> для используемых видов активностей с существующими значениями ПДК для анализируемых металлов.

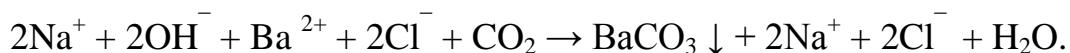
## Методы биоиндикации

### Респираторная активность почвенного микробного сообщества (ISO 14240-1)

Метод основан на инкубировании почвенных образцов в закрытых сосудах и титриметрическом определении выделившегося углекислого газа (CO<sub>2</sub>) после его адсорбции щелочью.

#### Ход определения

В коническую колбу с притертой пробкой помещают 20 см<sup>3</sup> 0,05 М раствора гидроокиси натрия (NaOH). Затем в нее помещают мешочек с 10 г увлажненной почвы (60% ПВ). Колбы герметично закрывают и инкубируют в течение 24 ч при температуре 28°C. После чего удаляют мешочек и в колбу с гидроокисью натрия добавляют 2 мл раствора хлорида бария для осаждения адсорбированного CO<sub>2</sub> в виде карбоната бария.



Добавляют 2 капли фенолфталеина, титруют остаточное содержание гидроксида натрия 0,1Н соляной кислотой. В качестве контроля осуществляют аналогичную процедуру без почвы. Повторность опыта и контроля – трехкратная.

Расчет количества выделившегося CO<sub>2</sub> проводят по формуле:

$$\text{CO}_2, \text{ мг/г} \cdot 24\text{ч} = \frac{(C - S) \cdot 2,2}{a}, \text{ где}$$

C – средний объем HCl, пошедший на титрование контроля (мл),

S – объем HCl, пошедший на титрование опытного образца (мл),

a – вес сухой почвы, взятой для анализа (г),

2,2 – пересчетный фактор (1 мл 0,1М HCl соответствует 2,2 мг CO<sub>2</sub>).

#### Средства измерений и материалы

1. колбы конические объемом 250 мл со шлифом по 3 шт. на образец, пробки, вакуумная смазка, марлевые мешочки, бюретка,

2. пробирки пластиковые объемом 50 мл с крышками по 3 шт. на образец, бюксы по 3 на образец, пипетки или дозатор на 1 мл, термостат, сушильный шкаф, центрифуга, фотоколориметр.

### *Приготовление растворов необходимых реагентов.*

- раствор гидроокиси натрия 0,05М. В мерной колбе на 1000 мл растворить 2 г гидроокиси натрия, довести до метки.
- раствор бария хлористого 0,5М. В мерной колбе на 100 мл в дистиллированной воде растворить 10,4 г хлорида бария, довести до метки.
- буферный раствор рН 6,7. В мерной колбе на 500 мл растворить 4,1 г калия фосфорнокислого двузамещенного ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и 8,67 г калия фосфорнокислого однозамещенного ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) и довести до метки.
- раствор мочевины 10%. В мерной колбе на 250 мл растворить 25 г мочевины (карбамида), довести до метки.
- раствор хлорида калия 1Н. В мерной колбе на 1000 мл растворить 74,5 г хлорида калия, довести до метки.

### **Уреазная активность почвенного микробного сообщества**

Метод основан на фотоколориметрическом определении содержания ионов аммония ( $\text{NH}_4$ ), образующегося в результате восстановления мочевины (по Хазиеву).

#### Ход определения

Взвешивают 2 г увлажненной почвы (60% ПВ) в пластиковую пробирку с крышкой. Приливают 4 см<sup>3</sup> фосфатного буфера (рН = 6,7), 0,2 см<sup>3</sup> толуола. Через 15 мин. добавляют 4 см<sup>3</sup> 10% раствора мочевины. Пробирку закрывают и инкубируют в течение 24 ч. при температуре 37°C. Через 24 ч. в каждую пробирку приливают 10 см<sup>3</sup> 1Н раствора хлорида калия и тщательно взбалтывают для вытеснения из почвы поглощаемого аммиака. Полученную суспензию центрифугировали (4000 об./мин). В полученный фильтрат в объеме 0,5-1 см<sup>3</sup>, переносят в стеклянную колбу объемом 25 см<sup>3</sup>, приливают 10–15 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, затем последовательно приливают по 1 см<sup>3</sup> раствора сегнетовой соли и реактива Несслера, доводят до метки дистиллированной водой. Полученный окрашенный раствор колориметрируют при синем светофильтре на спектрофотометре СФ-102 (400 нм, кювета 10 мм). Повторность опыта и



контроля – трехкратная. В качестве контроля используют почву, стерилизованную сухим жаром (180°C) в течение 1 ч. Содержание аммиака в фильтрате (мг/л) рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по сернокислому аммонiu. Расчет уреазной активности производят по формуле:

$$\text{мг NH}_4 / \text{кг сухой почвы} = \frac{C \cdot 25}{100 \cdot V_{\text{оп}} \cdot M_{\text{оп}}} - \frac{S \cdot 25}{100 \cdot V_{\text{к}} \cdot M_{\text{к}}}, \text{ где}$$

$C$  – содержание аммиака в фильтрате опытного образца (мг/л),

$S$  – содержание аммиака в фильтрате контроля (мг/л),

$V_{\text{оп}}$  – объем аликвоты фильтрата опытного образца, взятый для анализа (мл),

$V_{\text{к}}$  – объем аликвоты фильтрата контроля, взятый для анализа (мл),

$M_{\text{оп}}$  – масса сухой почвы опытного образца, взятой для анализа (г),

$M_{\text{к}}$  – масса сухой почвы контроля, взятой для анализа (г).

#### 4. Распределение работ по занятиям

№ занятия	Работа 1: Определение экологического состояния почв (биотестирование, элюатный метод)	Работа 2: Определение экологического состояния почв (биотестирование, контактный метод)	Работа 3: Определение экологического состояния почв (биоиндикация)
1	1) приготовление почвенных вытяжек, 2) постановка элюатного биотестирования с использованием семян овса, 3) постановка элюатного биотестирования с использованием зеленых водорослей, 4) постановка элюатного биотестирования с использованием микроорганизмов.	1) постановка контактного биотестирования с использованием семян овса	-
2	5) снятие показаний элюатного биотестирования с использованием зеленых водорослей, 6) снятие показаний элюатного биотестирования с использованием микроорганизмов 7) анализ полученных результатов		-
3		2) снятие показаний контактного биотестирования	1) постановка биоиндикации с использованием респираторной

		с использованием семян овса 3) анализ полученных результатов	активности аборигенной микрофлоры 2) постановка биоиндикации с использованием уреазной активности аборигенной микрофлоры
4	Анализ полученных результатов.		3) снятие показаний биоиндикации с использованием респираторной активности аборигенной микрофлоры 4) снятие показаний биоиндикации с использованием уреазной активности аборигенной микрофлоры 5) анализ полученных результатов

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон "Об охране окружающей среды" (от 10.01.2002 N 7-ФЗ ред. от 21.11.2011, с изм. от 07.12.2011)
2. Федеральный закон от 08.08.2001 N 128-ФЗ (ред. от 29.12.2010) "О лицензировании отдельных видов деятельности" (с изм. и доп., вступающими в силу с 01.01.2011)
3. ГОСТ 17.2.4.02-81. Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ;
4. ГОСТ 17.1.3.12-86. Охрана природы. Гидросфера. Общие правила охраны вод от загрязнения при бурении и добыче нефти и газа на суше;
5. ГОСТ 17.4.2.03-86. Охрана природы. Почвы. Паспорт почвы;
6. ГОСТ 20286-76. Радиоактивное загрязнение и дезактивация. Термины и определения; и др.
7. ISO 10712: Water Quality – *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test / International Standard. 1995, 10.
8. ISO 11269-2 Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. [Incorporating corrigendum, June 2009
9. ISO 14240-1: 2011: Determination of soil microbial biomass: Part 1: Substrate-induced respiration method
10. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф 16.1:2:3:3.7-04) Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* beijer).
11. ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф 16.1:2:3:3.9-06) Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов,

питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *DAPHNIA MAGNA STRAUS*.

- 12.ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф 16.1:2.3:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *PARAMECIUM CAUDATUM* Ehrenberg.
- 13.Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии./ Ф.Х. Хазиев., - М:Наука., 2005

*Учебное издание*

**Селивановская Светлана Юрьевна**

**Галицкая Полина Юрьевна**

**Ахметзянова Лейсан Габбасовна**

**Курынцева Полина Александровна**

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ К КУРСУ  
«НОРМИРОВАНИЕ И СНИЖЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ»**

Подписано в печать 30.05.2013.  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Формат 60х84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л.2,25.  
Тираж 100 экз. Заказ 142

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в Лаборатории оперативной полиграфии Издательства КФУ

420045, г. Казань, ул. Кр. Позиции, 2а  
тел. (843) 233-72-12